

JC675 U.S. PTO
09/730716
12/06/00

대한민국 특허청
KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

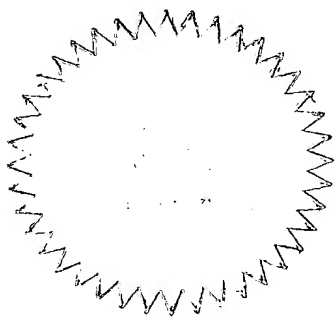
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 특허출원 1999년 제 55129 호
Application Number

출원년월일 : 1999년 12월 06일
Date of Application

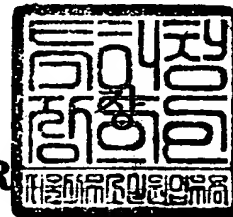
출원인 : 주식회사 제넥신 외 1명
Applicant(s)



2000 년 11 월 17 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	1999.12.06
【발명의 명칭】	원숭이에서 S I V m a c 2 3 9 의 감염에 대한 방어를 유도하는 A I D S D N A 백신
【발명의 영문명칭】	Plasmid DNA that prevents the simian immunodeficiency virus infection in monkeys
【출원인】	
【명칭】	주식회사 제백신
【출원인코드】	1-1999-058655-9
【출원인】	
【명칭】	학교법인 포항공과대학교
【출원인코드】	2-1999-900096-8
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	1999-065320-8
【발명자】	
【성명의 국문표기】	성영철
【성명의 영문표기】	SUNG,Young Chul
【주민등록번호】	560507-1010410
【우편번호】	790-390
【주소】	경상북도 포항시 남구 지곡동 교수아파트 6동 902호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	서유석
【성명의 영문표기】	SUH,You Suk
【주민등록번호】	700227-1009920
【우편번호】	790-390
【주소】	경상북도 포항시 남구 지곡동 133 기숙사 19-114
【국적】	KR
【심사청구】	청구

【미생물기탁】**【기탁기관명】** 생명공학연구소 유전자은행**【수탁번호】** KCTC 0702BP**【수탁일자】** 1999.11.27**【미생물기탁】****【기탁기관명】** 생명공학연구소 유전자은행**【수탁번호】** KCTC 0703BP**【수탁일자】** 1999.11.27**【핵산염기 및 아미노산 서열목록】****【서열개수】** 012**【서열목록의 전자문서】** 첨부**【취지】** 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
이원희 (인)**【수수료】****【기본출원료】** 20 면 29,000 원**【가산출원료】** 20 면 20,000 원**【우선권주장료】** 0 건 0 원**【심사청구료】** 14 항 557,000 원**【합계】** 606,000 원**【첨부서류】** 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 SIV(simian immunodeficiency virus) 유래의 유전자를 포함하는 AIDS 백신용 플라스미드에 관한 것으로, 본 발명에서는 SIV의 gag, dpol, env 및 rev 유전자를 포함하나 tat, nef는 포함하지 않는 플라스미드 pSIV/GE 및 SIV 유래의 pol 유전자를 포함하는 플라스미드 pSIV/pol; 플라스미드 pSIV/GE 및 pSIV/pol에서 SIV 유래의 유전자를 각각 HIV(human immunodeficiency virus) 유래의 대응 유전자로 치환시킨 플라스미드 pHIV/GE 및 pHIV/pol; pSIV/GE 및 pSIV/pol를 포함하는 DNA 백신; 및 pHIV/GE 및 pHIV/pol를 포함하는 DNA 백신을 제조한다. 본 발명의 플라스미드는, 종래 AIDS 예방용 DNA 백신에서 성공하지 못했던 동물 모델에서 우수한 효능을 보이므로 HIV 감염에 의한 AIDS 예방에 효과적으로 이용될 수 있을 뿐 아니라 치료용 백신으로 이용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

원숭이에서 S I V m a c 2 3 9 의 감염에 대한 방어를 유도하는 A I D S D N A 백신{Plasmid DNA that prevents the simian immunodeficiency virus infection in monkeys}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 SIV(simian immunodeficiency virus)의 전체 게놈과 비교하여 본 발명의 플라스미드 pSIV/GE 및 pSIV/pol에 포함된 SIV 유래 유전자의 콘스트럭트를 도식적으로 나타낸 것이고,

도 2는 본 발명에 사용한 플라스미드 pTV-SIV/GE와 pTV-SIV/pol의 제한 지도이고,

도 3은 본 발명의 플라스미드 pTV-SIV/GE와 pTV-SIV/pol을 COS-7 세포에 형질감염시킨 후 면역블롯팅(immunoblotting)을 이용하여 확인한 그림이고,

도 4는 SIVmac의 감염 이후 경과한 시간에 따라서 pTV를 투여한 대조군 원숭이의 혈액과, 본 발명의 플라스미드를 투여하여 면역 반응을 유도한 시험군 원숭이의 혈액에서 각각 감염된 면역세포 (PBMC)의 수를 표시한 것이고,

도 5는 SIVmac의 감염 이후 경과한 시간에 따라서 pTV를 투여한 대조군 원숭이와, 본 발명의 플라스미드를 투여하여 면역 반응을 유도한 시험군 원숭이에서, 각각 단위 혈액당 절대 CD4⁺ 세포 수를 나타낸 것이고,

도 6은 SIVmac의 감염 이후 경과한 시간에 따라서 pTV를 투여한 대조군 원숭이와, 본 발명의 플라스미드를 투여하여 면역 반응을 유도한 시험군 원숭이에서, 각각 전체 혈

액 면역세포 (PBL)중 CD29⁺CD4⁺ 세포의 비율을 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<7> 본 발명은 SIV(simian immunodeficiency virus) 유래의 유전자를 포함하는 AIDS 백신용 플라스미드에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 SIV의 gag, dpol, env 및 rev 유전자를 포함하나 tat, nef는 포함하지 않는 플라스미드 pSIV/GE 및 SIV 유래의 pol 유전자를 포함하는 플라스미드 pSIV/pol; 상기 두 플라스미드에서 SIV 유래의 유전자를 각각 HIV(human immunodeficiency virus) 유래의 대응 유전자로 치환시킨 플라스미드 pHIV/GE 및 pHIV/pol; 상기 두 플라스미드 또는 이들의 HIV 유전자 치환형 플라스미드를 포함하는 DNA 백신에 관한 것이다.

<8> 플라스미드 DNA는 어떠한 면역 증가제의 보조 첨가 없이 그 자체만으로 생쥐(mouse)에 주입되는 경우, 플라스미드 DNA에서 발현된 항원에 대하여 특이적인 항체를 형성하고, 방어 면역반응을 유도하는 것으로 보고되었다(Ulmer 등, Science, 259:1745, 1993). 이후, 여러 가지 바이러스의 유전자를 함유하는 DNA 백신을 동물 모델에 주입하면 체액성 면역반응과 세포성 면역반응이 유도된다는 보고가 있었다 (Chow 등, *J. Virol.*, 71:169, 1997; McClements 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:11414, 1996; Xiang 등, *Virology*, 199:132, 1994; Wang 등 *Virology*, 211:102 1995; Lee 등,

Vaccine, 17:473, 1999; Lee 등, *J. Virol.*, 72:8430, 1998).

- <9> DNA 백신은 소동물 연구에서 성공적인 연구를 보인 후 4년 만에 인간에 대한 임상 시험이 FDA에 의해 승인될 정도로 뛰어난 안전성을 가지고 있다. 또한 DNA 백신은 강력하고 지속적인 세포면역반응을 유도할 수 있다는 장점 때문에 AIDS 백신의 중요한 후보 물질로 대두되었다.
- <10> DNA 백신 이외에도 AIDS 백신의 후보물질로는 약독화 바이러스, 소단위(subunit) 백신, 생바이러스백터 백신 등이 있다. 이 중에서 약독화 바이러스는 가장 강력한 면역 반응을 유도하지만 피접종자의 체내에서 증식하기 때문에 질병을 일으키는 바이러스로 변환될 가능성이 높고, 실제로 원숭이 실험에서 AIDS를 일으켜 안전성의 문제가 제기되었다. 한편, 소단위 백신은 HIV로 부터의 방어에 필요한 CTL 면역반응을 유도하지 못하는 약점이 있으며, 생바이러스백터 백신은 백터 자체에 대한 면역 및 백터에 의한 질병이 유도될 가능성과 같은 단점을 안고 있다.
- <11> 그러나 이들 HIV에 대한 DNA 백신이 인간에게 사용되기 위해서는 영장류 실험을 통한 백신의 효능 검증이 필수적이다. 인간에게서 HIV-1의 감염에 대한 영장류 동물모델은 일으키는 질병의 심각성과 방어 면역반응을 유도하기 어려운 정도로 구분하여 HIV_{SF}/침팬지 모델로부터 SIVmac/레수스원숭이(SIVmac/rhesus monkey) 모델까지 구분한다. 특히 SIVmac/레수스원숭이 모델, 즉 SIVmac 바이러스를 레수스원숭이에 감염시키는 동물모델은 감염으로부터 방어되기가 매우 어렵고 사람에게서 HIV가 감염된 경우와 가장 유사한 모델로 평가받고 있다(Hanke 등, *J. Virol.*, 73:7524, 1999). SIVmac/레수스원숭이 모델은 (1) 감염후에 나타나는 면역반응의 양상, (2) 전염되는 방식, (3) 지속적인 감염(persistent infection)이 일어난다는 점, (4) CD4+ 세포수 감소와 연계된 질병의 유발,

(5) 중화항체로만은 감염 억제가 일어나지 않는 점, (6) 그리고 나중에는 감염된 개체에서 바이러스의 양이 증가하는 양상 등이 인간에게서 HIV-1의 감염 후 나타나는 양상과 유사하기 때문에, 비록 염기서열이 HIV와는 다르고 HIV보다 좀 더 맹독성(virulent)이라는 단점이 있지만 가장 바람직한 동물 모델로 판단된다. 현재까지 개발된 AIDS DNA 백신은 HIV_{SF}/침팬지 모델 같이 방어되기 쉬운 동물 모델에서는 감염을 억제하는 것이 보고되었지만, 침팬지는 HIV_{SF}의 감염에 의해 CD4+ 세포수의 감소나 AIDS와 같은 질병이 일어나지 않기 때문에 좋은 모델이 될 수 없다. 또 다른 동물 모델인 SHIV(Chimeric simian-human immunodeficiency virus)/원숭이 모델은 HIV의 env 유전자에 기초한 백신의 효능을 평가하기 위해 고안되었으며 처음 SHIV가 만들어졌을 때는 원숭이에서 질병을 유도하지 않았으나 생체내 계대(in vivo passage)를 거듭하는 동안 이들 중 일부가 원숭이에서 치명적인 질병을 유발하는 바이러스로 전이 되었다 (Reimann 등, *J. Virol.*, 70:6922, 1996). 그러나 이 모델에서 사용되는 SHIV는 자연계에 존재하지 않는 인위적인 재조합 바이러스라는 단점이 있다.

<12> 따라서 AIDS DNA 백신의 효능을 평가하기 위한 가장 이상적인 동물 모델은 SIVmac/레수스원숭이 모델이 될 것이다. 그러나, 지금까지 알려진 바로는 이 모델에서는 안전성에 문제가 있는 약독화 바이러스를 감염시킨 경우에만 SIV 감염을 방어하였고(Daniel 등, *Science*, 258:1938, 1992) DNA 백신을 포함하여 다른 종류의 백신에서는 모두 실패한 것으로 알려졌다 (Lu 등, *J. Virol.* 70:3978, 1996). 따라서 SIVmac/레수스원숭이 모델에서 방어를 유도할 수 있는 DNA 백신이 절실히 필요하다.

<13> 지금까지 SIVmac/레수스원숭이 모델에서 방어 면역반응 유도에 실패하였던 플라스미드 DNA 백신을 살펴보면, 한 플라스미드에서 gag, env, rev 유전자 뿐만 아니라 tat,

nef, vpr, vpx 등과 같은 보조 단백질도 발현되는 플라스미드 DNA를 사용하였으며 여러 종의 env 유전자를 가진 플라스미드 DNA를 함께 사용하였다 (Lu 등, *J. Virol.* 70:3978, 1996). 또한 HIV의 env 유전자를 가진 플라스미드와 gag/pol 유전자를 가진 플라스미드 DNA를 사용한 연구에서는 HIV_{SF}/침팬지 모델에서 방어에 성공하였지만(Boyer 등, 3:526, 1997), 이 모델은 방어 면역을 유도하기 쉽고 질병을 유발하지 않기 때문에 SIVmac/레수스원숭이 모델에서는 비슷한 효능을 보이지 않을 가능성이 높아 효과적인 AIDS 백신으로 사용될지는 의문이다. 기존 연구들에서 AIDS 백신이 효과적이지 못했던 가능한 이유는, (1) HIV의 경우 nef와 tat 등 보조유전자들이 시험관내 (in vitro) 실험에서 면역반응을 저해 및 교란하는 것으로 알려져 (Lindemann 등, *J. Exp. Med.* 179:797, 1994; Viscidi 등, *Science* 246:1606, 1989) 이 유전자들을 면역원으로 사용하면 인간과 원숭이에서 AIDS 바이러스에 대한 방어 면역반응 유도에 불리하게 작용할 수 있고 (2) HIV 유전자 중에 방어면역에 중요한 것으로 알려진 CTL 표지 (epitope)가 많이 있는 pol 유전자를 효과적으로 이용하지 못했기 때문이다.

<14> 지금까지 알려진 바로는 SIVmac/레수스원숭이 동물 모델에서 방어에 성공한 것은 안전성에 문제가 있는 약독화 바이러스를 백신으로 이용하였을 경우이다 (Daniel 등, *Science*, 258:1938, 1992). 따라서 SIVmac/레수스원숭이 모델에서 DNA 백신으로 방어를 유도할 수 있다면 플라스미드 DNA 자체가 안전성이 우수할 것으로 평가되고 있기 때문에 곧바로 인간에게 적용될 수 있을 것이다.

<15> 이에, 본 발명자들은 SIVmac/레수스원숭이 모델에서 AIDS 바이러스에 대하여 보다 우수한 방어 반응을 유도하는 신규의 DNA 백신용 플라스미드를 개발하고자 노력한 결과, SIV의 gag, dpol, env 및 rev 유전자를 가진 플라스미드와, 역전사효소

(reverse-transcriptase, RT)와 인테그라제(integrase)의 유전자인 pol을 포함하는 플라스미드를 개발하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<16> 본 발명의 목적은 SIVmac/레수스원숭이 모델에서 방어를 유도하는 플라스미드 백신을 개발함으로써 인간에게서 HIV에 의한 AIDS를 예방 및 치료할 수 있는 플라스미드 면역원을 확립하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<17> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 SIV(simian immunodeficiency virus)의 gag, dpol, env 및 rev 유전자를 포함하나 tat, nef는 포함하지 않는 플라스미드와, SIV 유래의 역전사효소(RT, Reverse Transcriptase)와 인테그라제(integrase) 유전자인 pol을 포함하는 플라스미드를 제공한다.

<18> 또한, 본 발명은 상기 두 플라스미드에 포함된 SIV 유래의 유전자를 각각 HIV(human immunodeficiency virus) 유래의 대응 유전자로 치환시킨 플라스미드를 제공한다.

<19> 또한, 본 발명은 상기 두 플라스미드 또는 이들의 HIV 유전자 치환형 플라스미드를 포함하는 DNA 백신을 제공한다.

<20> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- <21> 먼저, 본 발명은 SIV(simian immunodeficiency virus)의 gag, dpol, env 및 rev 유전자를 포함하나 tat, nef는 포함하지 않는 플라스미드와, SIV 유래의 역전사효소(RT, Reverse Transcriptase)와 인테그라제(integrase) 유전자인 pol을 포함하는 플라스미드를 제공한다.
- <22> 본 발명자들은 레수스원숭이에서 효능을 확인하기 위해 AIDS DNA 백신으로 하기 두 가지 종류의 플라스미드를 개발하였다.
- <23> 1) SIV의 gag, dpol, env 및 rev 유전자를 포함하나 tat, nef는 포함하지 않는 플라스미드.
- <24> 2) SIV 유래의 역전사효소(RT, Reverse Transcriptase)와 인테그라제(integrase) 유전자인 pol을 포함하는 플라스미드.
- <25> 편의를 위해 이하 상기 특징을 갖는 두 종류의 플라스미드를 통칭하여 각각 'pSIV/GE' 및 'pSIV/pol'로 약칭하기로 한다. 각각의 플라스미드는 다음과 같은 특징을 가진다.
- <26> 먼저 pSIV/GE는 SIV의 매트릭스 단백질(matrix protein, MA), 캡시드 단백질(capsid protein, CA) 및 핵캡시드 단백질(nucleocapsid protein, NC)를 암호화하는 유전자인 gag; pol 유전자 중 프로테아제(protease)를 암호화하는 유전자 부위인 dpol, Rev 단백질을 암호화하는 유전자인 rev, 외피단백질(envelope protein)를 암호화하는 유전자인 env 유전자를 가지며, 보조단백질을 암호화하는 유전자인 nef 및 tat 등은 가지지 않는다. 도 1은 pSIV/GE에 포함된 SIV 유래 유전자의 콘스트럭트(SIV/GE)를 도식적으로 보여준 것이다. 또한, 도 2는 본 발명의 바람직한 실시예로서 제조한 플라스미

드 pTV-SIV/GE의 제한 지도를 보여준다. SIV/GE와 SIV/pol을 삽입한 pTV2 벡터는 싸이토 메갈로 바이러스 (Cytomegalovirus)의 초기 프로모터/인핸서(early promoter/enhancer) 서열 (도 2에서 CMV라 표시)과 아데노바이러스 삼부 리더/인트론 서열(adenovirus tripartite leader/intron sequence, 도 2에서 TPL로 표시)을 가지며 SV40의 복제기점 (도 2에서 SV40 ORI로 표시) 및 폴리A 서열(도 2에서 SV40 PA로 표시)을 포함한다. pTV2 벡터는 본 발명자들이 이미 발표한 pTX (Lee 등, *Vaccine* 17:473. 1999)를 기초로 하여 제조되었으며 이미 소동물 연구에서 DNA 백신 벡터로 사용된 바 있다 (Lee 등 *J Virol.* 72:8430.1998 와 Cho 등 *Vaccine* 17:1136. 1999). 그러나, 상기 프로모터의 종류 및 당 단백질 신호서열의 종류 및 길이 등은 본 발명의 실시 목적에 따라 다양하게 변형할 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다.

<27> 한편 pSIV/pol은 SIV의 역전사효소(RT)와 인테그라제(integrase)를 암호화하는 유전자인 pol를 가지고 있다. pol 유전자의 인테그라제(integrase) 부위 중 염기서열 5130-5135 부위는 인테그라아제의 효소활성에 중요한 부위로 알려져 있으므로, 숙주세포에서의 증식을 막기 위해 5130-5135 부위를 변형시켜 인테그라제의 활성을 억제시킬 수 있다. 이와 같이 돌연변이 유전자를 사용하면 DNA 백신의 투여 후 피접종체에서 증식 가능한 바이러스가 생성될 아주 낮은 위험성을 더욱 낮춰 안전성을 증가시킬 수 있다. 이 때, 상기 염기서열의 위치 번호는 진뱅크 수탁번호(GenBank Accession Number) M33262의 SIVmac239 클론을 따랐다.

<28> 본 발명의 바람직한 실시예에서는 pol의 5' 말단에 헤페스 심플렉스 바이러스

(herpes simplex virus, HSV)의 당단백질 D(glycoprotein D, gD)의 N-말단 33개의 아미노산을 암호화한 신호서열(signal sequence)를 결합(fusion)시키고 CMV 프로모터의 직접

전사 조절을 받게 함으로써 RT 및 인테그라제(integrase)의 발현 강도를 증가시키고자 하였다. 또한, pol 유전자의 인테그라제(integrase) 부위 중 염기서열 5130-5132 부위를 결실시키고, 5133-5135 부위는 Asn₁₁₇ 대신 Ser₁₁₇이 발현되도록 돌연변이화시켰다. 자체 실험 결과, 이와 같이 변형시킨 SIVmac239 바이러스는 숙주세포에서 더 이상의 증식을 하지 못하였다. 도 1은 pSIV/pol에 포함된 SIV 유래 유전자의 콘스트럭트(SIV/pol)를 도식적으로 보여준 것이다. 또한, 도 2는 본 발명의 바람직한 실시예로서 제조한 플라스미드 pTV-SIV/pol의 제한 지도를 보여준다. 그러나, 상기 돌연변이 방법, 프로모터의 종류, 당단백질 신호서열의 종류 및 길이 등은 본 발명의 실시 목적에 따라 다양하게 변형할 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다.

<29> 상기 pTV-SIV/GE 및 pTV-SIV/pol 플라스미드는 대장균 DH5 α 균주에 형질전환시켰으며, 이들 형질전환균주를 1999년 11월 27일자로 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다 (수탁 번호 : 각각 KCTC 0702BP, KCTC 0703BP)

<30> 제조된 pTV-SIV/GE와 pTV-SIV/pol의 발현을 시험관내(in vitro) 세포배양 시스템에서 확인하기 위해, COS-7 세포(ATCC CRL-1651)에 각 DNA를 칼슘-포스페이트 방법으로 형질감염(transfection)시킨 후, 형질전환된 세포를 배양한 뒤 수확하여 독일의 영장류 센터(Deutsches Primatenzentrum)의 훈즈만(Hunsmann) 박사에게서 얻은 항SIVmac 항체로 면역블롯팅(immunoblotting) 실험을 수행하였다 (도 3 참조). pTV-SIV/pol과 pTV-SIV/GE 플라스미드는 대조벡터인 pTV2와는 달리 배양된 동물세포에서 SIV에 특이적인 항체와 결합하는 단백질을 발현하였으므로, 동물의 몸에 주입되었을 때도 SIV 단백질을 효과적으로 발현할 수 있음을 확인하였다.

- <31> 또한, 본 발명은 상기 플라스미드 pSIV/GE 및 pSIV/pol에 포함된 SIV 유래의 유전자를 각각 HIV(human immunodeficiency virus) 유래의 대응 유전자로 치환시킨 플라스미드 pHIV/GE 및 pHIV/pol을 제공한다.
- <32> 보다 구체적으로, pHIV/GE는 pSIV/GE에 포함된 SIV 유래의 유전자 gag, dpol, env, rev를 각각 HIV 유래의 유전자 gag, dpol, env, rev로 치환한 것이고, pHIV/pol은 SIV 유래의 유전자 pol을 HIV 유래의 유전자 pol로 치환한 것이다.
- <33> 본 발명의 시험예들에 의하면, 본 발명의 플라스미드 pTV-SIV/GE 및 pTV-SIV/pol을 DNA 백신으로 이용하여 레수스원숭이에 투여하는 경우, SIVmac239의 감염이 최후에는 완전히 억제되었을 뿐만아니라 (도 4 참고) SIVmac239의 감염에 의한 AIDS 진행의 전형적인 증상인 CD4⁺ 세포 수 감소 현상이 억제되고(도 5 참조) 면역 기능의 저하를 의미하는 CD29⁺CD4⁺ 세포의 비율 감소 현상 또한 억제되는(도 6 참조) 것으로 밝혀졌다.
- SIVmac/레수스원숭이 모델은 감염으로부터 방어되기가 매우 어렵고, 현재까지 개발된 모델 중 사람에게서 HIV가 감염된 경우와 가장 유사한 모델로 평가받고 있다(Hanke 등, *J. Virol.*, 73:7524, 1999). 따라서, 본 발명의 시험예에서 나타난 결과에 의하면, pTV-SIV/GE 및 pTV-SIV/pol로 대표되는 본 발명의 플라스미드 pSIV/GE 및 pSIV/pol의 HIV 치환형 플라스미드 pHIV/GE 및 pHIV/pol이 인간의 AIDS 예방 및 치료를 위한 DNA 백신으로 사용될 수 있음이 명백하다.
- <34> 또한, 본 발명은 상기 플라스미드 pSIV/GE 및 pSIV/pol, 또는 pHIV/GE 및 pHIV/pol을 포함하는 AIDS 예방 및 치료용 DNA 백신을 제공한다.

- <35> 상기 DNA 백신은 SIV 또는 HIV의 감염에 의해 유발되는 AIDS(acquired immunodeficiency syndrome)을 예방 및 치료하기 위해 사용된다. 구체적으로, 플라스미드 pSIV/GE 및 pSIV/pol을 포함하는 DNA 백신은 SIV 감염에 의한 원숭이의 AIDS 예방 및 치료에 사용될 수 있으며, pHIV/GE 및 pHIV/pol을 포함하는 DNA 백신은 인간의 AIDS 예방 및 치료에 사용될 수 있다.
- <36> 상기 DNA 백신의 구체적인 투여 방법 및 제형은 일반적인 백신, 특히 DNA 백신의 투여 방법 및 제형을 따른다. 즉, 본 발명의 DNA 백신은 임상투여시에 비경구로 투여할 수 있으며 일반적인 의약품제제의 형태로 사용될 수 있다.
- <37> 본 발명의 시험예들에 의하면, 본 발명의 플라스미드 pTV-SIV/GE 및 pTV-SIV/pol을 DNA 백신으로 이용하여 레수스원숭이에 투여하는 경우, SIVmac239의 감염이 최후에는 완전 억제되었을 뿐만아니라(도 4 참고) SIVmac239의 감염에 의한 AIDS 진행의 전형적인 증상인 CD4⁺ 세포 수 감소 현상이 억제되고(도 5 참조) 면역 기능의 저하를 의미하는 CD29⁺CD4⁺ 세포의 비율 감소 현상 또한 억제되는(도 6 참조) 것으로 밝혀졌다.
- pTV-SIV/GE 및 pTV-SIV/pol은 본 발명이 제공하는 플라스미드 pSIV/GE 및 pSIV/pol의 전형적인 구현예이므로, 이러한 결과는 본 발명의 DNA 백신의 유효 성분으로 pSIV/GE 및 pSIV/pol, pHIV/GE 및 pHIV/pol 등이 사용될 수 있음을 의미한다.
- <38> 상기 DNA 백신에 포함되는 플라스미드의 유효용량은 0.01~0.1 mg/kg 이고, 바람직하기로는 0.02~0.05 mg/kg 이다.

- <39> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<40> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<41> <실시예 1> SIV의 면역원으로 사용한 플라스미드 DNA의 제조

<42> 플라스미드 pTV-SIV/GE를 제조하기 위하여 SIVmac239 클론(Regier 등, AIDS Res. Hum. Retroviruses, 6:1221-1231, 1990; GenBank Accession No. M33262로 기재됨)을 주형으로 중합효소연쇄반응(PCR)로 증폭하여 본 발명의 pTV-SIV/GE 및 pTV-SIV/pol에 포함된 SIV 유전자를 얻었다.

<43> 구체적으로, pTV-SIV/GE는 다음과 같이 제조하였다.

<44> 즉, 각각 KpnI과 XbaI을 서열을 가진 합성 올리고뉴클레오타이드 1193Kpn(서열번호 1)과 3464Xba(서열번호 2)를 PCR 프라이머로 이용하여 증폭한 산물을 Kpn과 XbaI으로 부분 절단하여 이중 SIVmac239의 염기서열 1193에서부터 3464까지를 pBluescript SK+(Stratagene)의 SalI, XbaI 부위에 삽입하여 pSK-SIVgag를 만들었다. 이어서 각각 XbaI, NotI 서열을 가지는 합성 올리고뉴클레오타이드 6695Xba (서열번호 3)와 9641NotI(서열번호 4)를 이용하여 증폭한 다음 산물을 NotI, XbaI 으로 잘라 pSK-SIVgag을 NotI, XbaI으로 부분 절단한 부위에 삽입하여 pSK-SIV/ge-1 을 만들었다. 또한 SIVmac239 클론을 주형으로 하여 8328Cla(서열번호 5)와 9535Xho(서열번호 6) 합성 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 사용하여 PCR 방법으로 증폭한 다음, 그 산물을 ClaI, XhoI으로 잘라 pBluescript-SK+(Stratagene)의 SmaI 위치에 삽입하여 pSK-SIVenv3 를 만들었다.

pSK-SIV/GE를 만들기 위해 pSK-SIV/ge-1를 ClaI, NotI으로 잘라 벡터를 포함한 부분을

pSK-SIVenv3를 *Cla*I, *Not*I으로 자른 벡터를 포함하지 않은 부분과 결합하였다. 만들어진 pSK-SIV/GE DNA의 *Kpn*I과 *Not*I을 잘라 pTV2 (Lee 등, J. Virol., 72:8430, 1998)의 I/*Not*I 자리에 삽입하여 pTV-SIV/GE를 제조하였다.

<45> 한편, pTV-SIV/pol은 다음과 같이 제조하였다. 즉, *Bam*HI과 *Xho*I 자리를 가진 합성 올리고뉴클레오타이드(각각 서열번호 7 및 서열번호 8)를 PCR 프라이머로 하여 SIVmac239의 염기서열 3105에서 5668까지를 증폭한 후 *Bam*HI과 *Xho*I 제한효소로 자른 다음, *Bgl*II와 *Xho*I 제한효소로 E2를 제거한 pSK+gDsE2 (Lee 등, J. Virol., 72:8430, 1998)에 상기 PCR 증폭된 *Bam*HI/*Xho*I 단편을 삽입하여 pSK+gDsSIV/pol을 제조하였다. pSK+gDsSIV/pol의 인테그라제(integrase) 부위 중 5130-5132 서열을 제거하였고 5133-5135 서열은 Asn₁₁₇ 대신 Ser₁₁₇이 발현되도록 돌연변이화시켜 pSK+gDsSIV/polm을 만들었다. pol 유전자의 돌연 변이화를 위하여 pSK+gDsSIV/pol를 주형으로 하고 두가지 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머(서열번호 9 및 서열번호 10)를 사용하여 PCR을 수행한 다음 산물을 자체 결합시켜 pSK+gDsSIV/polm을 만들었다. 최종적으로 pTV-SIV/pol을 제조하기 위해서 pSK+gDsSIV/polm를 *Not*I과 *Xho*I 제한효소로 잘라 pTV2 (Lee 등, J. Virol., 72:8430, 1998)의 같은 제한효소 부위에 삽입하였다.

<46> 한편 SIV DNA백신으로 유도되는 면역반응을 더욱 증가시킬 목적으로 각각 싸이토카인 IL-2(interleukin-2)와 GM-CSF(granulocyte/macrophage-colony stimulating factor)를 추가적으로 발현하는 pTV-SIV/pol-IL-2와 pTV-SIV/GE-GC를 제조하였다. 구체적으로, pTV-SIV/pol-IL-2를 만들기 위해 인간 IL-2 유전자 (Chung 등, I

Hsueh Tsa Chih 13:78, 1993)를 EMCV(Encephalomyocarditis virus) 의 IRES(internal ribosomal entry site) 서열에 연결한 후 이것을 먼저 pTV 벡터에 삽입한 다음 pSK+gDsSIV/polm의 SIV 유전자 부위를 IRES의 5' 말단에 삽입하여 제조하였다. 한편, pTV-SIV/GE-GC를 제조하기 위해, 먼저 SupT-1 세포(한국세포주은행)를 콘카나발린 A(Concanavalin A)로 활성화시킨 후, 서열번호 11 및 서열번호 12로 기재되는 프라이머를 이용한 RT-PCR 방법으로 인간 GM-CSF 유전자를 얻었으며, 얻은 인간 GM-CSF 유전자를 IRES와 연결하고 pTV 벡터 안에 삽입하였으며 pSK-SIV/GE에서 SIV 유전자를 절단하여 IRES의 5' 말단에 삽입하여 제조하였다.

<47> 한편, 상기 pTV-SIV/GE, pTV-SIV/pol, pTV-SIV/pol-IL-2와 pTV-SIV/GE-GC는 대장균 DH5 α 균주에 형질전환하였으며, 이를 배양한 다음 CsCl-EtBr 방법으로 정제하여 하기 실시예에 사용하였다. 이들 형질전환균주는 1999년 11월 27일자로 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다 (수탁 번호 : KCTC 0702BP, KCTC 0703BP).

<48> 상기 pTV-SIV/GE 및 pTV-SIV/pol의 제조 과정에서 염기서열 번호는 모두 SIVmac239의 염기서열을 기준으로 한 것이다. 또한, 상기 과정에서 제한효소의 사용, 염기서열의 삽입, 대장균 형질전환, 플라스미드 정제 등의 유전자 조작 방법은 모두 샘브룩 등의 방법(*Molecular Cloning*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 미국, 1989)에 따랐다.

<49> <실시예 2> pTV-SIV/GE와 pTV-SIV/pol 플라스미드를 사용한 원숭이의 면역화

<50> 실시예 1에서 제조된 플라스미드를 식염수(0.85% NaCl)에 1 mg/ml의 농도로 녹인

1019990055129

다음 시험군 원숭이 (rhesus monkey) 한 마리 당 pTV-SIV/GE와 pTV-SIV/pol을 각각 400 ug 씩 총 800 ug을 근육주사 하였다 (전체 2마리). 대조군의 원숭이 (3마리)는 SIV 유전자를 가지지 않은 벡터 DNA (pTV) 800 ug을 같은 방법으로 주입 하였다.

<51> 또 다른 시험군(3마리)에서는 pTV-SIV/GE, pTV-SIV/pol와 함께 싸이토카인 유전자를 가진 pTV-SIV/GE-GC와 pTV-SIV/pol-IL-2를 각각 200 ug 씩 한 마리당 역시 800 ug의 DNA를 접종하였다. 마지막 시험군(3마리)은 DNA 면역화와 소단위 백신(subunit vaccine)의 면역화를 조합으로 하였을때의 방어 면역반응을 확인하기 위한 것으로, 두 번째 면역화까지는 pTV-SIV/GE와 pTV-SIV/pol을 사용하였고 세 번째부터 다섯 번째 면역은 SIV의 p27 단백질 (Intracell), gp120 단백질 (Intracell), 대장균에서 발현 정제한 RT 단백질을 한 마리당 각각 50 ug 씩 명반(alum)을 면역증강제로 사용하여 면역화하였다. 상기 RT 단백질은 본 발명자가 SIVmac239의 RT 유전자를 pRSET 벡터에 클로닝 하여 대장균 BL21 균주에서 발현시킨 다음 메탈 친화 레진(Pharmacia)을 이용한 크로마토그래피법으로 정제하여 얻은 것이다.

<52> 최초 면역화 후 7주, 17주, 25주, 44주째 되는 날에 각군의 원숭이를 처음 면역화한 것과 같은 DNA를 사용하여 같은 방법으로 주입하였다.

<53> <실시예 3> SIVmac239를 이용한 면역화된 원숭이의 감염

<54> 최종 면역화 후 2주 후 (처음 면역화 한지 46주) 미리 정해진 MID50 (monkey infectious dose)의 10배량의 SIVmac239(영장류 센터, Deutsches Primatenzentrum, 독일; 투여량 1 ml)를 혈액 주사하여 감염시켰다.

<55> <실험예 1> 혈액에서 SIV에 감염된 면역세포 수의 측정

<56> 플라스미드 DNA에 의한 면역화가 원숭이에서 어느정도로 SIVmac239를 제거할 수 있는 면역반응 (sterilizing immunity)를 유도하였는지 또는 완전히 바이러스를 제거하지 못했더라도 바이러스의 증식을 억제하는 면역반응을 유도하였는지 알아보기 위해 혈액의 면역세포(PBMC, peripheral blood mononuclear cells)의 SIV 감염 정도를 조사하였다. SIVmac239의 감염 뒤 1주, 2주, 4주, 8주, 12주, 16주, 20주, 24주 째 되는 시점에서 대조군 및 시험군 원숭이 혈액의 면역세포(PBMC)를 분리하여 100만개의 PBMC 중 SIV에 감염된 PBMC의 수를 절대희석배양(limiting-dilution cocultivation) 방법으로 측정 하였다 (Lu 등, J. Virol. 70:3978, 1996).

<57> 도 4에서 보듯 pTV로 면역화한 대조군의 원숭이에서는 SIVmac239를 감염시킨지 1, 2 주째에 감염된 PBMC의 수가 급격히 증가하며 이후 100만 PBMC중 100-10000개의 감염 세포수를 유지한다. 그러나 본 발명의 플라스미드 pTV-SIV/GE 및 pTV-SIV/pol로 면역화한 원숭이 중 한 마리는 감염 후 1, 2주째 매우 낮은 바이러스 감염 PBMC 수를 보이다가 4 주부터 바이러스가 감염된 세포가 전혀 발견되지 않았다. 이 결과는 이 원숭이가 SIVmac239의 감염을 완전히 방어하여 바이러스를 효과적으로 제거 하였음을 의미한다. 또한 나머지 한 마리 원숭이는 감염 후 4 주째 바이러스에 감염된 PBMC 수가 최고에 이르지만 이 후 감소하여 20주, 24 주에는 바이러스에 감염된 PBMC가 검출되지 않는 것으로 보아 이 원숭이의 면역기능이 바이러스의 증식을 억제 하고 있음을 보여 준다.

<58> SIV 유전자와 함께 싸이토카인 유전자를 가진 DNA 백신으로 면역한 시험군에서는

대조군과 마찬가지로 바이러스의 증식억제가 일어나지 않았다. 이것은 함께 투여된 싸이토카인 유전자가 바이러스 증식에 유리한 쪽으로 면역반응의 활성화를 유도 했기 때문 일 것이다. 또 다른 시험군인 SIV DNA로 면역화 후 소단위 백신으로 부스트 면역화 한 원숭이들 역시 대조군과 차이가 없었는데, 이는 소단위 단백질에 의한 면역화가 DNA를 사용한 부스트 면역화와 비교하여 SIVmac의 방어에 필요한 정도의 면역반응을 유도하지 못했거나 바이러스 증식에 유리한 쪽으로 면역반응을 변환시켰기 때문일 것이라고 추정 할 수있다.

<59> <실험예 2> 혈액에서 절대 CD4⁺ 세포의 수 측정

<60> 원숭이 및 사람에게서 AIDS의 진행을 판단하기 위한 가장 일반적인 방법으로서, 단위 혈액 당 절대 CD4⁺ 세포의 수를 측정하였다. SIVmac의 감염 뒤 1주, 2주, 4주, 6주, 8주, 12주, 16주, 20주, 24주, 28주째 되는 시점에서 원숭이 혈액의 말초혈 임파구(PBL, peripheral blood lymphocytes)중 CD4⁺ 세포의 수를 FACS(fluorescent automated cell sorter; Becton-Dickinson, FACScan)를 사용하여 측정하였다 (Bjorn 등, *J. Virol.* 72:7846, 1998).

<61> 도 5에서 보듯 벡터 DNA를 면역화한 원숭이에서는 SIVmac239를 감염시킨지 1, 2, 4주째 CD4⁺ 세포 수의 감소가 일어나며 28주 째에는 감염시키기 전 (-1 주)과 비교하여 현저한 감소를 보인다. 그러나 본 발명의 플라스미드 DNA로 면역화한 원숭이는 각 시점에서 평균적으로 대조군 보다 높은 CD4⁺ 세포수를 보이며 28주째에도 감염되기 전과 비슷한 수의 CD4⁺ 세포수를 유지하고 있다. 이 결과는 본 발명이 제공하는 플라스미드에

의한 면역화가 SIVmac239의 감염으로 유도되는 절대 CD4⁺ 세포수의 감소를 효과적으로 억제함을 의미한다.

<62> 한편, 싸이토카인 유전자가 들어간 DNA로 면역화한 시험군과 DNA로 면역화한후 소 단위 백신을 투여한 시험군에서는 대조군과 마찬가지로 절대 CD4⁺ 세포수의 감소가 유발되었다.

<63> <실험예 3> 혈액에서 CD29⁺CD4⁺ 세포의 비율 측정

<64> 전체 면역세포 중 CD29⁺CD4⁺ 세포의 비율은 사람과 원숭이에서 면역기능의 저해를 결정하는 초기 예측 마커로 알려져 있다 (Blatt 등, *J. infect Dis.* 171:837, 1995; Kneitz 등, *Vet Immunol. Immunopathol.*, 36:239, 1993). SIVmac의 감염 뒤 1주, 2주, 4주, 6주, 8주, 12주, 16주, 20주, 24주, 28주째 되는 시점에서 원숭이 혈액의 말초혈 임파구(PBL, peripheral blood lymphocytes)중 CD29⁺CD4⁺ 세포의 비율을 FACS로 측정하였다 (Bjorn 등, *J. Virol.* 72:7846, 1998).

<65> 도 6에서 보듯 대조군의 벡터 DNA를 면역화한 원숭이에서는 SIVmac239를 감염시킨 지 1, 2, 4 주째 CD29⁺CD4⁺ 세포 비율의 감소가 일어나며 28주 째에는 전체 말초혈 임파구의 5% 미만으로 떨어진다. 그러나 본 발명의 플라스미드 DNA로 면역화한 원숭이는 각 시점에서 평균적으로 대조군 보다 높은 CD29⁺CD4⁺ 세포 비율을 보이며 28주째에도 감염되기 전의 정상적인 원숭이에서 나타나는 10-20% 비율과 비슷한 정도의 CD29⁺CD4⁺ 비율을 유지하고 있다. 이 결과는 SIVmac239가 유도하는 CD29⁺CD4⁺ 세포 비율의 감소, 즉 면역기능의 저해를 본 발명의 플라스미드가 효과적으로 억제함을 의미하며, 실험예 1, 2

의 결과와도 일치하는 것이다.

<66> 한편 싸이토카인 유전자가 들어간 DNA로 면역화한 시험군과 DNA로 면역화한 후 소단위 백신을 투여한 시험군에서는 대조군과 마찬가지로 전체 면역세포 중 CD29⁺CD4⁺ 세포 비율의 감소가 유발 되었다.

【발명의 효과】

<67> 이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명자는 AIDS DNA 백신 개발을 위해 가장 이상적이고 방어하기 어려운 동물 모델인 SIVmac/레수스원숭이 모델을 사용하여 SIVmac의 감염을 억제할 수 있고 면역기능의 저하를 완벽히 예방할 수 있는 DNA 백신을 최초로 개발하였다. 본 발명의 AIDS DNA 백신은 지금까지 알려진 다른 AIDS 백신보다 안전하면서도 훨씬 효능이 뛰어 난 것으로 평가 할 수 있으며, 본 발명의 DNA 백신에서 SIV 유전자에 해당하는 서열을 대응하는 HIV서열로 교체한 것은 인간에게서도 비슷한 효능을 보일 것으로 추정된다. 특히, DNA 면역화에 의해 바이러스의 증식을 억제하고 바이러스를 완전제거하는 현상을 보였으므로, 본 발명자의 DNA 백신은 AIDS 바이러스의 감염을 막아주는 예방용 백신 뿐만 아니라, 이미 AIDS 바이러스에 감염된 사람에게서 사용된다면, 다른 AIDS 치료제와의 병용으로 적은 수만 남아있는 바이러스를 완전히 제거하거나 AIDS 로의 진행을 현저하게 억제해주는 치료용 백신으로도 사용될 수 있다. 본 발명은 영장류 실험에서 AIDS DNA 백신의 성공을 보임으로써 인간에서도 AIDS DNA 백신개발이 성공될 것임을 제시한다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

SIV(simian immunodeficiency virus)의 gag, dpol, env 및 rev 유전자를 포함하나 tat, nef는 포함하지 않는 플라스미드

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 플라스미드는 도 1에 기재된 SIV/GE 유전자 콘스트럭트를 포함하는 것을 특징으로 하는 플라스미드

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 플라스미드는 도 2에 기재된 pTV-SIV/GE인 것을 특징으로 하는 플라스미드 (수탁 번호: KCTC 0702BP)

【청구항 4】

제 1항의 플라스미드에 포함된 SIV 유래의 유전자를 HIV(human immunodeficiency virus) 유래의 대응 유전자로 치환시킨 플라스미드

【청구항 5】

SIV 유래의 역전사효소(RT, Reverse Transcriptase)와 인테그라제(integrase) 유전자인 pol을 포함하는 플라스미드

【청구항 5】

【청구항 6】

제 5항에 있어서, pol 유전자는 인테그라아제(integrase)의 효소활성에 중요한 부위가 변형됨으로써 활성이 억제된 인테그라제를 암호화하는 것을 특징으로 하는 플라스미드

【청구항 7】

제 6항에 있어서, 인테그라제(integrase)의 효소활성에 중요한 부위는 염기서열 5130-5135 부위이고, 염기서열 5130-5132 부위가 결실되고 5133-5135 부위가 세린에 대한 코돈으로 치환된 것을 특징으로 하는 플라스미드

【청구항 8】

제 5항에 있어서, pol은 그 5' 말단에 분비형 단백질의 신호 서열(signal sequence)을 연결한 것을 특징으로 하는 플라스미드

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 분비형 단백질은 헤페스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus)의 당단백질 D(glycoprotein D)인 것을 특징으로 하는 플라스미드

【청구항 9】

【청구항 10】

제 5항에 있어서, 플라스미드는 도 1에 기재된 SIV/pol 유전자 콘스트럭트를 포함하는 것을 특징으로 하는 플라스미드

【청구항 11】

제 5항에 있어서, 플라스미드는 도 2에 기재된 pTV-SIV/pol인 것을 특징으로 하는 플라스미드 (수탁 번호: KCTC 0703BP)

【청구항 12】

제 5항의 플라스미드에 포함된 SIV 유래의 유전자를 HIV(human immunodeficiency virus) 유래의 대응 유전자로 치환시킨 플라스미드

【청구항 13】

제 1항의 플라스미드 및 제 5항의 플라스미드를 포함하는 AIDS 예방 및 치료용 DNA 백신

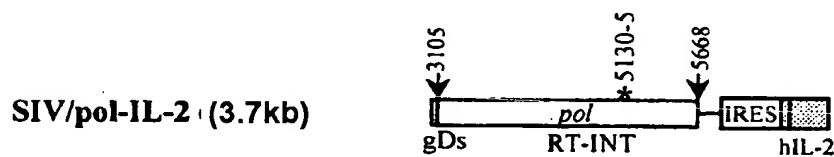
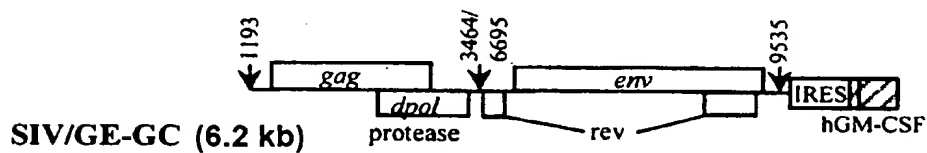
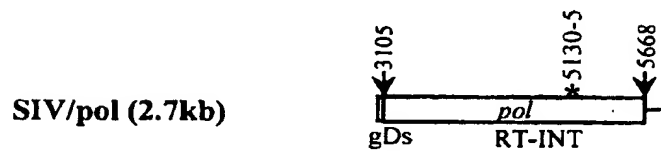
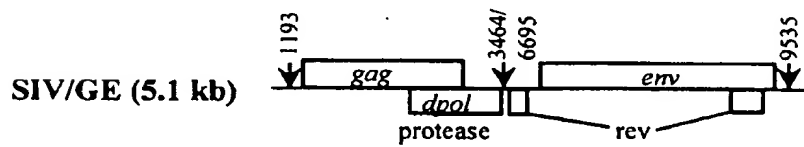
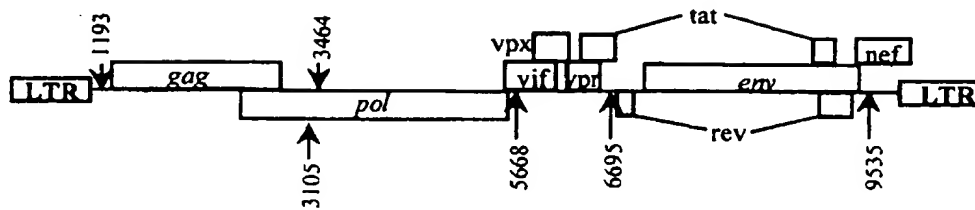
【청구항 14】

제 4항의 플라스미드 및 제 12항의 플라스미드를 포함하는 AIDS 예방 및 치료용
DNA 백신

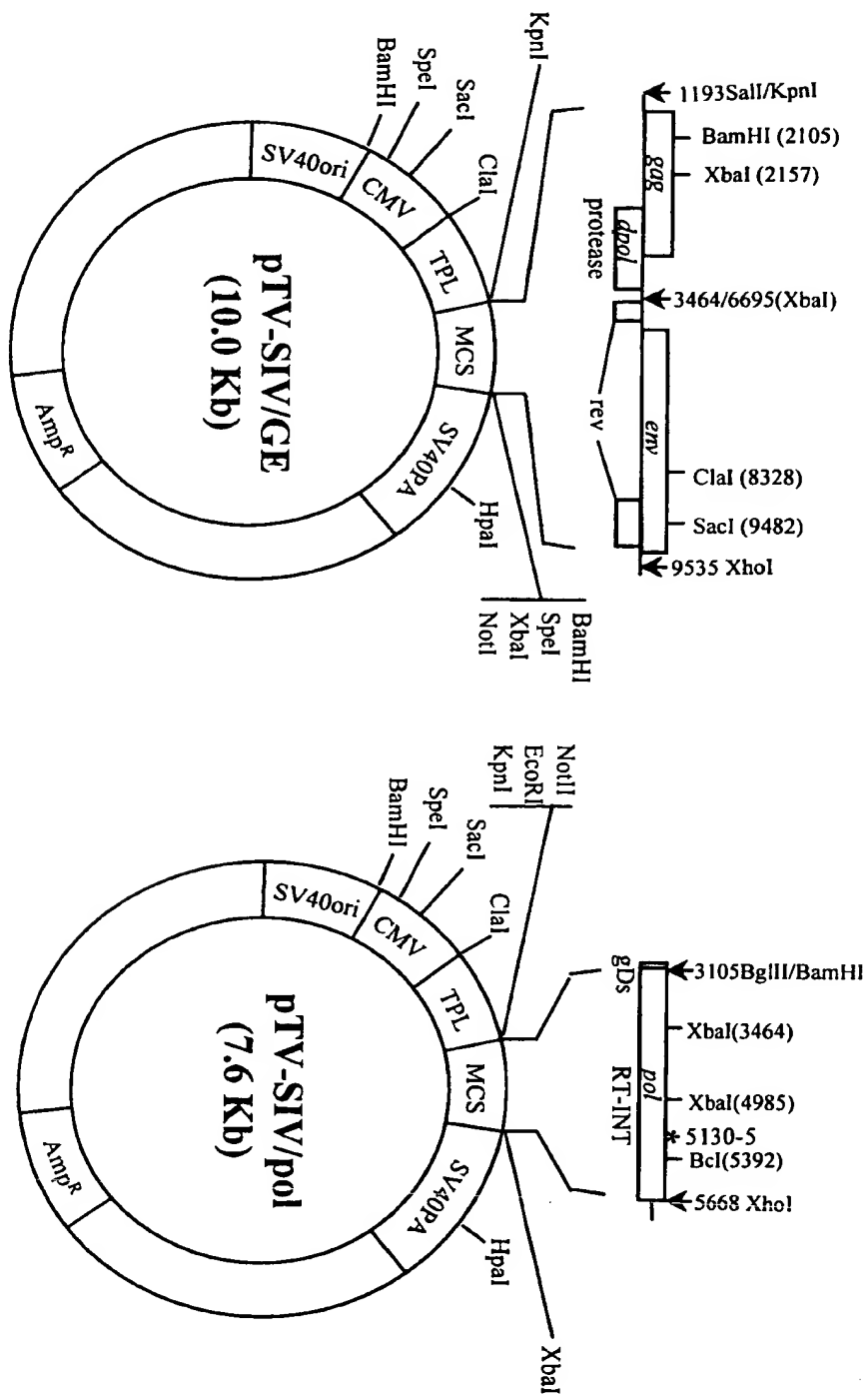
【도면】

【도 1】

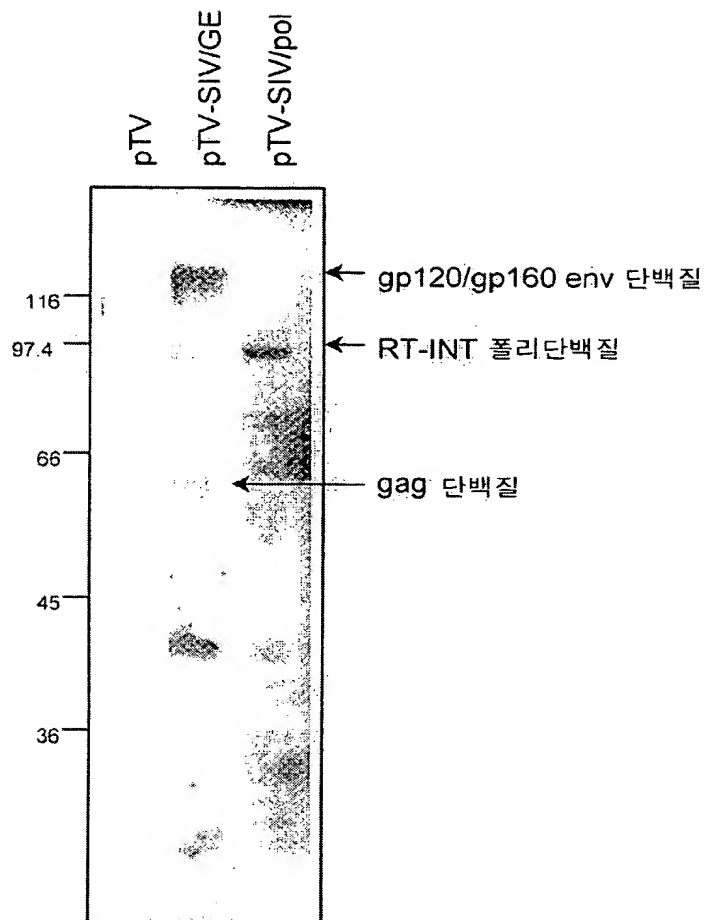
SIVmac239



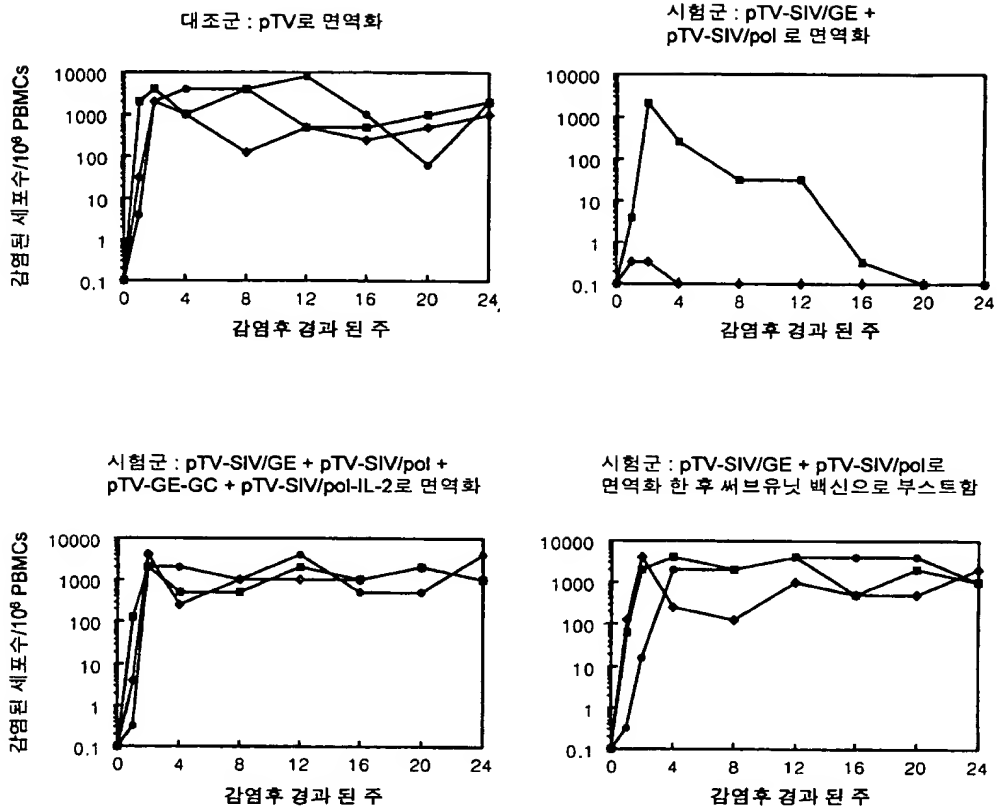
【도 2】



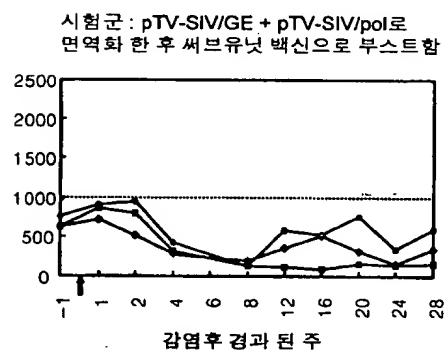
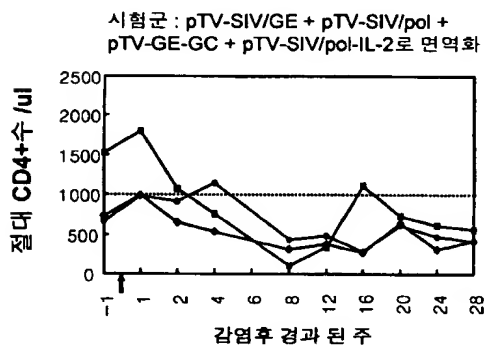
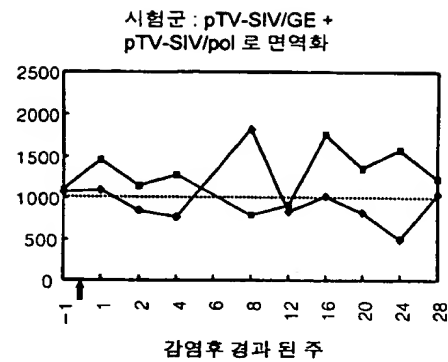
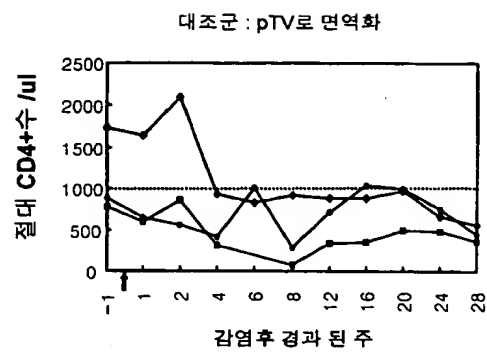
【도 3】



【도 4】

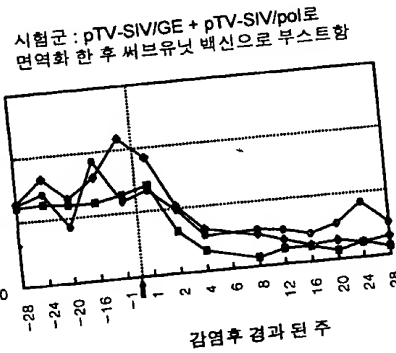
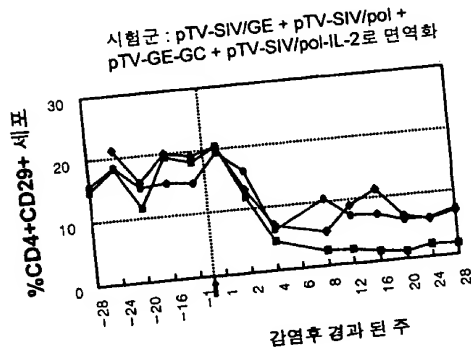
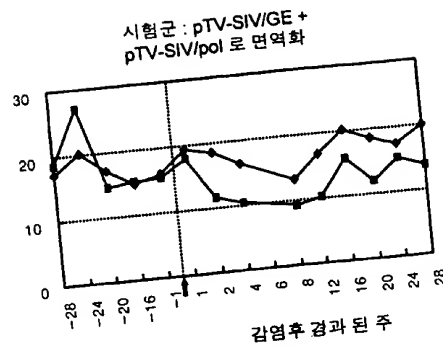
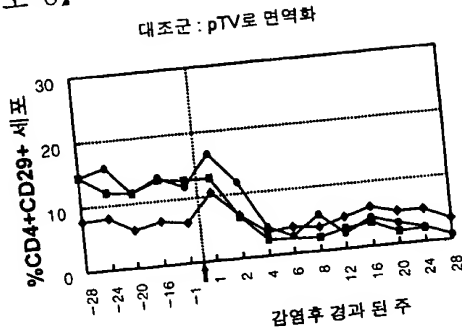


【도 5】



1019990055129

【도 6】



【서열목록】

<110> Genexine Inc.
 that prevents the simian immunodeficiency virus infection in monkeys
 <130> 9p-11-44 <160> 12 <170> KOPATIN 1.5 <210>
 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
 <223> 1193Kpn, a synthetic oligonucleotide primer <400> 1
 cgggtcggta ccagacggcg
 <210> 2 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial

Sequence <220> <223> 3464Xba, a synthetic oligonucleotide primer
 <400> 2 atctagaggt atggagaaat at

22 <210> 3 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> 6695Xba, a synthetic oligonucleotide primer
 <400> 3 gccctctaga agcatgctat

20 <210> 4 <211> 32 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> 9641NotI, a synthetic oligonucleotide primer
 <400> 4 ggaagcggcc gcctcactga taccctacc aa

32 <210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> 8328Cla, a synthetic oligonucleotide primer
 <400> 5 actgtatcga ttggaattgg

20 <210> 6 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> 9535Xho, a synthetic oligonucleotide primer
 <400> 6 ctccctcgag tattcatata ctgtccctga

30 <210> 7 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> BamHI-tag primer <400> 7 aatggatcca
 tagctaaagt agag 24 <210> 8

<211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220>
 <223> XhoI-tag primer <400> 8 atttctcgag gctatgccac ctctc

25 <210> 9 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> a PCR primer for the mutagenesis of pol gene

<400> 9 agtggtgcta actttgcttc gcaa

24 <210> 10 <211> 23 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> a PCR primer for the mutagenesis of pol gene

<400> 10 tgtgtgtaga tgtgtaatag gcc

23 <210> 11 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> hGM-CSF specific primer (forward) <400>

11 tggaccatgg ggctgcagag cctgctgctc 30

<210> 12 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> hGM-CSF specific primer (reverse) <400>

12 tgggaattct cactcctgga ctggctccca 30

출력 일자: 2000/11/20

1019990055129

【서류명】

서지사항 보정서

【수신처】

특허청장

【제출일자】

1999. 12. 20

【제출인】

주식회사 제백신

【명칭】

1-1999-058655-9

【출원인코드】

출원인

【사건과의 관계】

【제출인】

학교법인 포항공과대학교

【명칭】

2-1999-900096-8

【출원인코드】

출원인

【사건과의 관계】

【대리인】

이원희

【성명】

9-1998-000385-9

【대리인코드】

【사건의 표시】

10-1999-0055129

【출원번호】

1999. 12. 06

【출원일자】

1999. 12. 06

【심사청구일자】

원숭이에서 SIVmac239의 감염에 대한 방어를 유도하는
AIDS D NA 백신

【발명의 명칭】

【제출원인】

1-1-99-0164046-45

【접수번호】

1999. 12. 06

【접수일자】

특허출원서

【보정할 서류】

【보정할 사항】

【보정대상 항목】

대리인

【보정방법】

정정

【보정내용】

【대리인】

이원희

【성명】

9-1998-000385-9

【대리인코드】

1999-065320-8

【포괄위임등록번호】

1999-066370-1

【포괄위임등록번호】

【취지】

특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다. 대리인
이원희 (인)

【수수료】

【보정료】 11,000 원

【기타 수수료】 원

【합계】 11,000 원